

На правах рукописи

**Михайлова
Екатерина Вячеславовна**

**ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА ДРОЖЖЕЙ, ПРОДУКТА
ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АМИНОИМИДАЗОЛ РИБОТИДА, НА АМИЛОИДЫ
IN VIVO И IN VITRO**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург
2012**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук

- Научный руководитель: доктор биологических наук
Сойдла Тыну Рихович
Институт цитологии РАН
- Официальные оппоненты: **Журавлева Галина Анатольевна**,
доктор биологических наук, профессор
Биолого-почвенный факультет
Санкт-Петербургского государственного
университета
- Маргулис Борис Александрович**,
доктор биологических наук
Институт цитологии РАН,
ведущий научный сотрудник
- Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение Научно-исследовательский
институт экспериментальной медицины
Северо-Западного отделения Российской
академии медицинских наук

Защита диссертации состоится «23» марта 2012 года в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д.4
e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru
Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>
Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «22» февраля 2012 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Существует ряд заболеваний человека и животных, диагностическим признаком которых является отложение в тканях амилоидов – фибриллярных образований, обогащенных β -структурами. Морфологически амилоиды представляют собой линейные неразветвленные фибриллы длиной до нескольких микрометров и диаметром 10-20 нм, состоящие из отдельных протофиламентов. Для амилоидов характерны общие биохимические свойства: амилоидные фибриллы устойчивы к действию высокой температуры, денатурирующих агентов и к некоторым протеазам (химотрипсину и протеиназе К), а их способность специфически связывать некоторые низкомолекулярные соединения (Конго красный и тиофлавин Т) широко используется для наблюдений за динамикой образования амилоидов в системе *in vitro* и в тканях млекопитающих (Herczenik, Gebbink, 2008).

При некоторых заболеваниях, например, болезнях Альцгеймера, Гентингтона, Паркинсона, говорят о корреляции между образованием амилоидов и развитием дегенеративных изменений некоторых типов клеток головного мозга, приводящим к нарушениям когнитивных функций и функций нервно-мышечной системы. Более того, в ряде случаев белок в амилоидной форме, передаваясь между особями одного вида и даже между видами, является непосредственной причиной возникновения тяжелых заболеваний центральной нервной системы у человека и животных. Эти амилоиды, представляющие собой инфекционные агенты белковой природы, получили название прионов (Wickner et al., 2008).

В качестве модельной системы для изучения амилоидозов и прионных болезней млекопитающих широко используются штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, работа с которыми позволяет применять большой набор методов молекулярной биологии и биохимии (Xue et al., 2010). У этого вида найдено несколько собственных белков, способных к прионизации, среди которых одним из наиболее изученных является $[PSI^+]$ -фактор – прионная форма белка Sup35. Переход большей части этого белка в амилоидные агрегаты приводит к увеличению прочитывания нонсенс кодонов, что легко отследить по изменению фенотипа. Клетки, в которых прионное состояние Sup35 самовоспроизводится и не воспроизводится, названы $[PSI^+]$ и $[psi^-]$ соответственно (Chernoff, 2004).

В настоящее время эффективных терапевтических подходов к лечению заболеваний, связанных с амилоидами, не разработано (Charveriat et al., 2009), поэтому изучение молекулярного механизма амилоидогенеза, а также поиск новых факторов, способных влиять на образование амилоидов и предотвращать цитотоксическое действие как уже сформированных амилоидных фибрилл, так и промежуточных продуктов амилоидогенеза – «олигомеров», кажутся оправданными и необходимыми.

Перспективной группой веществ, препятствующих образованию амилоидных фибрилл, являются производные имидазола. Одно подобное соединение – 5-фосфат-рибозил-аминоимидазол (АИР) лежит в основе полимера, образующегося в клетках дрожжей *S. cerevisiae* при некоторых мутациях в пути биосинтеза аденина и придающего колониям дрожжевых клеток характерный красный цвет, поэтому этот полимер получил название «красный пигмент» (Smirnov et al., 1967).

Мы предположили, что наличие в клетке этого производного имидазола либо напрямую, либо опосредованно, за счет усиления активности защитных систем клетки, может приводить к уменьшению количества прионов и других амилоидов, делая красный пигмент дрожжей-сахаромицетов перспективной основой для создания противоамилоидных препаратов.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение влияния красного пигмента, продукта полимеризации аминокимидазолриботида, на образование амилоидных фибрилл в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Получение и анализ изогенных штаммов *S. cerevisiae*, отличающихся накоплением красного пигмента.
2. Сравнение количества агрегированных белков в лизатах, выделенных из полученных штаммов.
3. Выявление и анализ у полученных штаммов изменений количества [PSI^+] фактора – амилоидной формы белка Sup35.
4. Оценка общего количества амилоидных структур в полученных штаммах, по интенсивности флуоресценции красителя тиюфлавина Т.
5. Идентификация белков, агрегация которых зависит от наличия в клетках штамма красного пигмента.
6. Выявление и анализ действия красного пигмента, полученного из клеток *S. cerevisiae*, на амилоидизацию инсулина и лизоцима *in vitro*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Образование в клетках дрожжей красного пигмента снижает количество агрегированных белков и амилоидов в клетках дрожжей.
2. Присутствие в клетках дрожжей красного пигмента приводит к снижению количества [PSI^+]-фактора.
3. Идентифицированы 48 белков, присутствие которых во фракции агрегированных белков зависит от наличия красного пигмента в клетке. К этим пигмент-зависимым белкам относятся шапероны, а также белки, вовлеченные в метаболизм глюкозы, в стрессовый ответ и в процессы трансляции и протеолиза.
4. Присутствие в системе *in vitro* красного пигмента приводит к торможению роста амилоидов инсулина.

5. Предложен механизм действия красного пигмента *in vivo*, который состоит в связывании красного пигмента с амилоидными фибриллами, что приводит к снижению доступности этих участков для факторов, участвующих в амилоидогенезе.

Научная новизна полученных результатов

Предложен метод сравнительной количественной оценки содержания амилоидов в клетках с использованием красителя тиофлавина Т.

Впервые показано, что продукт полимеризации аминоксидазола риботида – красный пигмент – вызывает уменьшение количества $[PSI^+]$ -фактора в клетках дрожжей.

Впервые показано, что красный пигмент снижает скорость роста амилоидов инсулина *in vitro*.

Теоретическое и практическое значение работы.

В работе показано наличие большого количества белков, которые связаны с амилоидами только при отсутствии в клетках красного пигмента. Идентификация этих белков позволила разделить их на 4 основных группы в соответствии с выполняемыми функциями: шапероны, ферменты метаболизма глюкозы, белки, участвующие в клеточном ответе на окислительный стресс, и белки, участвующие в процессах трансляции и протеолиза. Эти данные вносят вклад в понимание механизмов, связанных с деградацией амилоидных структур и с образованием сложных комплексов с растворимыми белками прионами и амилоидами в дрожжевой клетке.

Данные, свидетельствующие о влиянии красного пигмента на образование амилоидных фибрилл в системе *in vitro* и *in vivo*, могут служить основой для дальнейших исследований возможности применения полимера аминоксидазола риботида или его производных для лечения заболеваний, связанных с образованием амилоидов. В частности, наши данные о снижении количества приона $[PSI^+]$ в клетках в присутствии красного пигмента позволяют предлагать дальнейшее изучение возможностей применения этого соединения для лечения прионных инфекций.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на школе-конференции “Bioinformatics and systems biology” (Новосибирск, 2010), на V российском симпозиуме “Белки и пептиды” (Петрозаводск, 2011), на VI Петербургской встрече лауреатов Нобелевской премии «Наука и общество: Физиология и медицина XXI века» (Петербург, 2011).

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00750а).

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП "Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ".

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ: статьи в рецензируемых журналах – 4, статьи в сборниках научных работ – 1, тезисы докладов – 3.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», выводов, списка цитируемой литературы и трех приложений. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков и 8 таблиц.

Материалы и методы исследований

Штаммы. Основные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе, указаны в таблице 1.

Таблица 1.

Основные штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе.

Название штамма	Генотип и плазмотип	Источник
LL20	<i>MATα leu2 his3</i>	Л.Н. Миронова и Г.А. Журавлева, кафедра генетики СПбГУ
74-D694 сокр.: 74-D	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu2 [PSI⁺_{weak} PIN⁺]</i>	Л.Н. Миронова и Г.А. Журавлева
74-D694/Gu1 сокр.: 74-D/Gu	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu2 [psi⁻ pin⁻]</i>	Л.Н. Миронова и Г.А. Журавлева
OT56	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu2 [PSI⁺_{strong} PIN⁺]</i>	Л.Н. Миронова и Г.А. Журавлева
АН/В сокр.: В	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 lys9 kar1 [psi⁻ pin⁻]</i>	А.С. Борхсениус, кафедра генетики СПбГУ
GT26	<i>MATα aro7-1 cys1-72 his4-166 leu2-1 lys2-187 met8-1 trp5-48 ura3-1 [PSI⁺ PIN⁺]</i>	Ю.О. Чернов, Технологический институт штата Джорджия, Атланта,

		США
GT27	<i>MATa aro7-1 cys1-72 his4-166 leu2-1 lys2-187 met8-1 trp5-48 ura3-1 [psi⁻ pin⁻]</i>	Ю.О. Чернов
168tester сокр.: 168t	<i>MAT a his5 [PSI⁺]</i>	Т.С. Карпова, Национальный институт рака, Бетесда, США
YTK79 сокр.: YTK	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 lys2</i>	Т.С. Карпова
K5-13 сокр.: K-13	<i>MATa his5 kar1-1[PSI⁺]</i>	Б.Ф.Яровой, ПИЯФ, Санкт-Петербург
K5-5A сокр.: K-5	<i>MATa his4 ade2 kar1-1 [psi⁻]</i>	Б.Ф. Яровой

Методы. Цитодукцию проводили в соответствии с работой (Zakharov, Yarovoy, 1977) с некоторыми изменениями: зиготы, а затем их первые почки изолировали с помощью микроманипулятора, выращивали на полной питательной среде YEPD в течение 2-3 дней, после чего тестировали на соответствующих селективных средах.

Лизаты клеток сравниваемых штаммов получали механическим разрушением клеток и центрифугированием при 100 g в течение 5 мин. Для получения фракции осадочных белков, обогащенной амилоидами и другими агрегатами, лизаты выравнивали по количеству белка и центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин. Полученные осадки проводили через ряд дополнительных обработок. Для разделения белков в агарозном геле осадки однократно обрабатывали PBS (150 mM NaCl, 25 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7,4). Перед разделением методом SDS-PAGE осадки обрабатывали 8M мочевиной, затем дважды PBS и три раза 2 %-ным раствором SDS в PBS при 37 °C, чтобы избавиться от неприоновых белковых агрегатов и удалить слабо ассоциированные белки из агрегатов прионов (Kryndushkin et al., 2003).

Экстракцию белков из осадков выполняли в буферном растворе (0,15 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 50 mM DTT) в течение 15 мин при 37 °C. Для разрушения агрегатов пробы 10 мин выдерживали при 100 °C и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин.

Для разделения агрегированных белков использовали электрофорез в горизонтальной системе в агарозном геле, содержащем 0,1 % SDS (SFR agarose, Amresco, США) в условиях, указанных в работе (Bagriantsev et al., 2006). При работе с белками использовали метод электрофореза в

денатурирующих полиакриламидных гелях (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Двумерное электрофоретическое разделение белков включало 2 стадии: изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) с последующим разделением в SDS-PAGE. ИЭФ выполняли в 18 см Immobiline™ DryStrip геле, pH 3—10, с использованием системы Ettan IPGphor II IEF (GE Helthcare, Великобритания). Образцы растворяли в 350 мкл стандартного ИЭФ буфера (8 М мочевины, 2 % CHAPS, 2 % ИЭФ буфер, pH 3—10, 1,2 % DeStreak реагент). Последующее разделение по молекулярному весу осуществляли в 15%-ном SDS-PAGE.

Для определения белков, присутствие которых в осадочной фракции зависит от наличия в клетках красного пигмента, использовали масс-спектрометрию. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск по «пептидному фингерпринту» проводили в базе данных NCBI среди белков всех организмов.

Измерение интенсивности флуоресценции (ИФ) тиофлавина Т измеряли при длинах волн возбуждения и эмиссии 435 и 486 нм соответственно, на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian Inc., США).

Для выделения из клеток и очистки от примесей красного пигмента использовали схему, предложенную Смирновым (Smirnov et al., 1967). Для получения амилоидных фибрилл *in vitro* выбрали белки инсулин и лизоцим.

Получение фибрилл инсулина осуществляли следующим образом: раствор бычьего инсулина (Sigma, США) с концентрацией 2 мг/мл в буфере, содержащем 20 % CH₃COOH и 100 мМ NaCl (pH 2.0), выдерживали в течение 24 ч при температуре 37 °С и постоянном перемешивании. Получение фибрилл лизоцима осуществляли, как описано в работе (Perys et al., 1993). Когда оценивали влияние красного пигмента на формирование фибрилл, в растворы добавляли красный пигмент (0,06 мг/мл). Полученные амилоидные фибриллы центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин и дважды отмывали PBS для удаления свободного красного пигмента.

Для анализа морфологии получаемых амилоидных фибрилл использовали трансмиссионную электронную микроскопию. Препараты изучали при помощи электронного микроскопа LIBRA-120 (Carl Zeiss, Германия).

Для оценки и анализа полученных данных применяли стандартные методы статистики в пакете STATISTICA 6.

Результаты и их обсуждение

Раздел 1. Влияние красного пигмента на количество амилоидов в дрожжевых клетках.

Первой задачей для оценки возможного действия красного пигмента стало качественное сравнение агрегированных белков в изогенных штаммах,

отличающихся цветом колоний. Для этого мы использовали метод разделения агрегатов в 1,8%-ном агарозном геле (Kryndushkin et al., 2003).

Мы получили выборку красных штаммов, у которых накопление красного пигмента подавлялось индукцией дополнительных мутаций, и, наоборот, штаммов белого цвета, в которых индуцировали мутации в генах *ADE1* или *ADE2*, приводящие к накоплению красного пигмента. Кроме того, изменение цвета колоний достигали физиологическим воздействием – рост на среде с избытком аденина (YEPD-ADE) приводит к блокированию образования красного пигмента.

Результаты сравнения осадочных фракций полученных пар приведены на рис. 1.

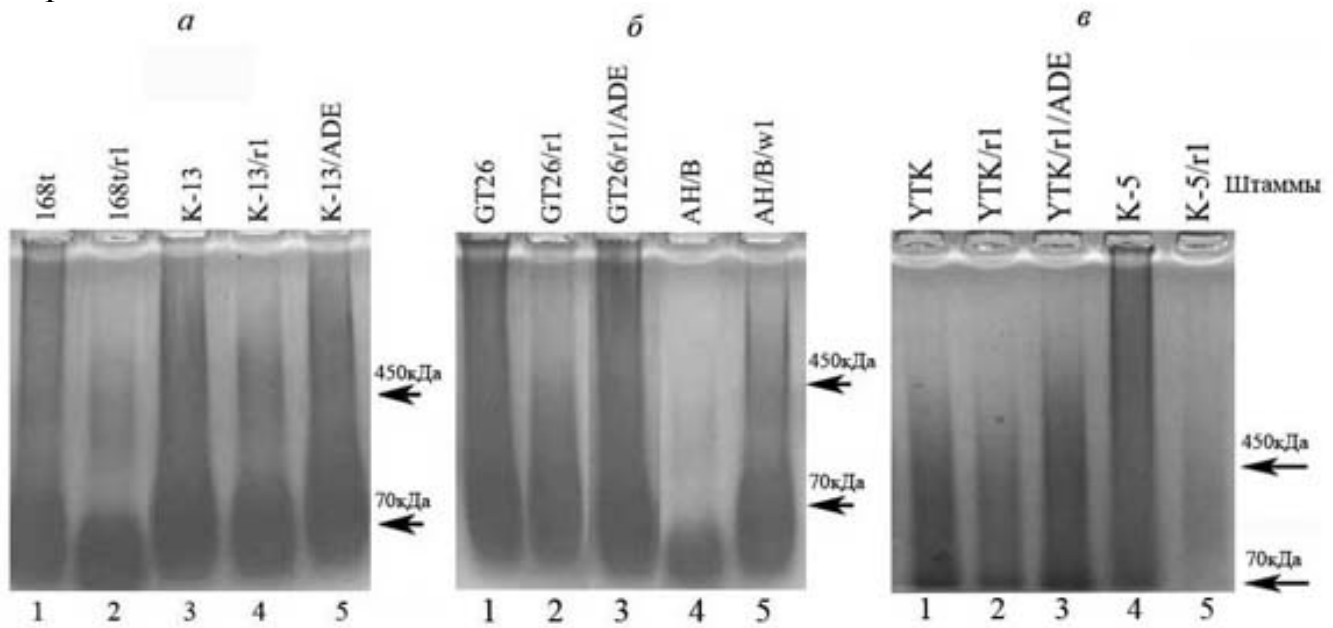


Рис. 1. Электрофореграммы осадочных белков красных и белых изогенных штаммов в 1,8%-ном агарозном геле.

а, б, в: соседние дорожки представляют белые и красные дериваты штаммов; дорожки 5 (*а*), 3 (*б* и *в*) – штаммы, выращенные на среде с избытком аденина (YEPD-ADE).

Во всех случаях, в каждой изогенной паре белый штамм (дорожки *а* 1, 3, 5; *б* 1, 3, 5; *в* 1, 3, 4) содержит фракцию белков с молекулярной массой больше 450 кДа, которая у штаммов, накапливающих красный пигмент, значительно редуцирована (дорожки *а* 2, 4; *б* 2, 4; *в* 2, 5). Выращивание штамма на среде YEPD-ADE приводит к восстановлению фракции осадочных белков до уровня белых штаммов. На основании полученных данных можно предположить, что во всех штаммах содержится достаточное количество белков, способных переходить в агрегированное состояние, однако наличие красного пигмента подавляет этот переход.

Следующая задача состояла в том, чтобы определить, влияет ли присутствие красного пигмента не на общее количество белковых агрегатов клетки, а именно на амилоиды. Для этого мы оценили уровень

прионизированного белка Sup35 – $[PSI^+]$ -фактора в полученных изогенных штаммах, отличающихся цветом колоний.

На рис. 2 *а* представлены данные, полученные для штамма К-13. Видно, что пятно материала, реагирующего на антитела к Sup35 (дорожка 2), больше выражено в случае исходного белого штамма.

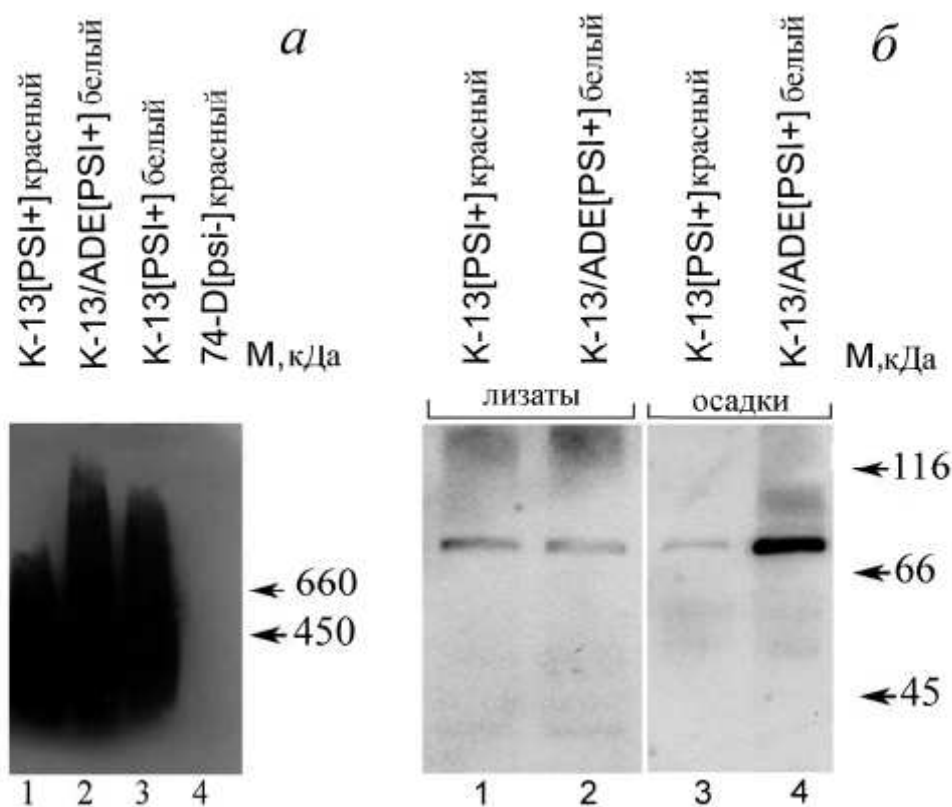


Рис.2. Блот-гибридизация с антителами к белку Sup35.

а – осадочные белки, выделенные из клеток: **1** – *ade2* мутанта штамма К5-13 красного цвета; **2** – *ade2* мутанта штамма К5-13, выращенного на среде YEPD-ADE; **3** – $[PSI^+]$ штамма К5-13 белого цвета; **4** – $[psi^-]$ штамма 74-D красного цвета, использованного в качестве отрицательного контроля. Разделение белков проводили в 1,5 %-ном агарозном геле.

б – лизаты клеток: **1** – *ade2* мутанта штамма К5-13 красного цвета; **2** – *ade2* мутанта штамма К5-13, выращенного на среде YEPD-ADE, а также осадочные белки, содержащиеся в штаммах: **3** – *ade2* мутанта штамма К5-13 красного цвета; **4** – *ade2* мутанта штамма К5-13, выращенного на среде YEPD-ADE. Разделение белков проводили в 15 %-ном SDS-PAG.

Чтобы убедиться, что наблюдаемые различия не связаны с разницей в уровне экспрессии белка Sup35 в красных и белых штаммах, мы разделили лизаты и осадочные фракции, агрегаты в которых предварительно разрушили, в 15%-ном SDS-PAG, и провели блот-гибридизацию с антителами к белку Sup35. На рис. 2 *б* видно, что синтез Sup35 у красного штамма К-13 (дорожка 1) и штамма, выросшего на среде YEPD-ADE

(дорожка 2), одинаков. В то же время количество Sup35 во фракции осадочных белков, больше в белом штамме (дорожка 3), чем в красном (дорожка 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на одинаковый уровень экспрессии белка Sup35 в красных и белых изогенных штаммах, при отсутствии красного пигмента количество агрегированного и, скорее всего, прионизированного, Sup35 возрастает.

Для подтверждения того, что различия, наблюдаемые на электрофореграммах, действительно соответствуют разному количеству амилоидных агрегатов, а также для более достоверной оценки различий между красными и белыми штаммами был использован метод оценки количества амилоидов с помощью красителя тиофлавина Т.

Мы сравнили показатель интенсивности флуоресценции (ИФ) тиофлавина Т при добавлении его к осадочным фракциям белых/красных изогенных пар. Результаты, полученные при анализе трех штаммов и их производных, представлены на рис. 3.

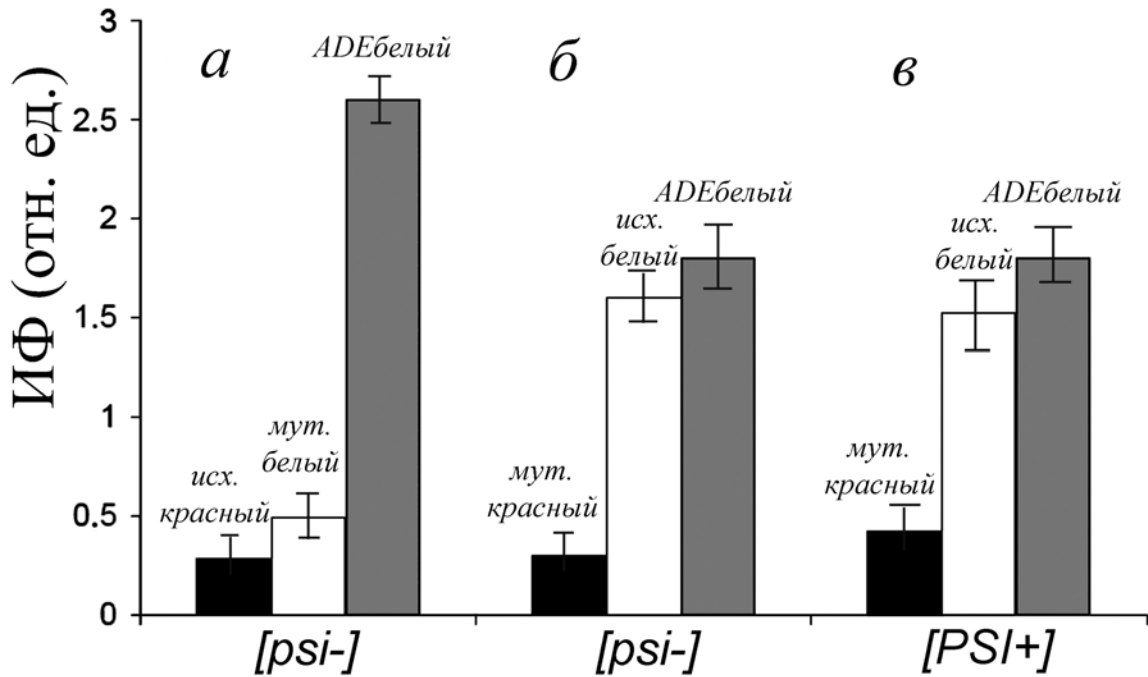


Рис. 3. Значения интенсивности флуоресценции (ИФ) тиофлавина Т, связанного с амилоидами осадочной фракции изогенных штаммов, различающихся по содержанию приона [PSI^+] и по накоплению красного пигмента. Вертикальными отрезками представлены 95%-ные доверительные интервалы.

а: исходный красный K-5[psi^-], полученный из него белый мутант K-5/w1[psi^-] и K-5/ADE[psi^-] – исходный штамм K-5, в котором накопление красного пигмента блокировалось при росте на среде YEPD-ADE;

б: мутант красного цвета 168t/r1[psi^-], исходный белый штамм 168t[psi^-], а также 168t/r1/ADE[psi^-] – 168t/r1, в котором накопление красного пигмента блокировалось при росте на среде с десятикратным избытком аденина;

6: мутант красного цвета GT26/r1[*PSI*⁺], исходный белый штамм GT26[*PSI*⁺] и GT26/r1/ADE[*PSI*⁺] —штамм GT26/r1, в котором накопление красного пигмента блокировалось при росте на среде с десятикратным избытком аденина.

При анализе данных видно, что когда штамм перестает накапливать красный пигмент (либо при появлении дополнительной мутации в генах биосинтеза аденина, либо при выращивании на среде с десятикратным содержанием аденина), значения ИФ тиофлавина Т возрастают. Когда в исходно белом штамме появляются мутации *ade1* или *ade2*, приводящие к накоплению красного пигмента, наблюдается понижение ИФ.

Для дальнейшего анализа зависимости количества амилоидов в дрожжевых клетках от них красного пигмента мы увеличили выборку изогенных красных/белых пар.

В табл. 2 приведены значения интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при связывании с фракцией осадочных белков, выделенных из 9 изогенных красных/белых пар. В отдельной графе указаны мутации исходных штаммов и дополнительные мутации, приведшие к прекращению накопления красного пигмента.

Таблица 2

ИФ фракции осадочных белков изогенных пар штаммов, отличающихся накоплением красного пигмента

№ пары	Цвет культуры	Штамм	Генотип по аденину	Плазмo-тип	ИФ	Отношение бел./кр.
1	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	К5-5 К5-5/w1	<i>ade2</i> <i>ade2ade5,7</i>	[<i>psi</i> ⁻] [<i>psi</i> ⁻]	285 496	1,7
2	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	АН/В АН/В/w1	<i>ade1</i> <i>ade1ade6</i>	[<i>psi</i> ⁻] [<i>psi</i> ⁻]	246 446	1,8
3	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	74-D/Gu 74-D/Gu/w1	<i>ade1</i> <i>ade1ade6</i>	[<i>psi</i> ⁻] [<i>psi</i> ⁻]	228 321	1,4
4	<u>Розов</u> <u>Бел</u>	74-Dw 74-Dw/w1	<i>ade1</i> <i>ade1ade6</i>	[<i>PSI</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺]	348 788	2,3
5	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	К-13/r1 К-13	<i>ade2</i>	[<i>PSI</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺]	322 2265	7,0
6	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	К-13/r3 К-13	<i>ade2</i>	[<i>PSI</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺]	212 2266	10,7
7	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	GT26/r1 GT26	<i>ade1</i>	[<i>PSI</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺]	420 1517	3,6
8	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	168t/r1 168t	<i>ade1</i>	[<i>psi</i> ⁻] [<i>psi</i> ⁻]	364 1617	4,4
9	<u>Кр</u> <u>Бел</u>	YTK/r1 YTK	<i>ade1</i>	(?) (?)	182 1996	11,0

Примечания. Подчеркнут цвет полученного мутантного штамма. В названии штамма: r – мутант красного цвета (кр), w – мутант белого цвета (бел). Двусторонний критерий знаков для 9 пар на 1%-ном уровне: границы 1 и 8. Различия между красными и белыми клетками достоверны при $p < 0,01$.

Данные табл. 2 говорят о том, что при получении из красного или розового штамма белого мутанта, в котором благодаря дополнительной мутации красный пигмент не накапливается (пары 1–4), значение ИФ значительно увеличивается. И, наоборот, если из белого штамма получить красный за счет мутации в гене *ADE1* или *ADE2* (пары 5–9), это приводит к понижению величины ИФ.

Выращивая красные штаммы на среде с высоким содержанием аденина, мы также можем повысить показатели интенсивности их флуоресценции. Об этом свидетельствует табл. 3, в которой приводятся данные сравнений интенсивности флуоресценции тиофлавина Т для 9 независимых пар.

Таблица 3

Влияние десятикратного увеличения количества аденина (ADE) в среде на ИФ осадочных белков у штаммов красного цвета

№ пары	Штаммы и их генотип по аденину	10-кратная добавка	Цвет культуры	ИФ	Отношение бел/кр
1	K5-5 <i>ade2</i>	— ADE	Кр Бел	284 2663	9,35
2	АН/В <i>ade1</i>	— ADE	Кр Бел	246 8369	3,39
3	74-D/Gu <i>ade1</i>	— ADE	Кр Бел	227 1740	7,65
4	74-Dw <i>ade1</i>	— ADE	Розов Бел	347 1206	3,47
5	K-13/r1 <i>ade2</i>	— ADE	Кр Бел	322 2460	7,64
6	K-13/r3 <i>ade2</i>	— ADE	Кр Бел	212 2468	11,60
7	GT26/r1 <i>ade1</i>	— ADE	Кр Бел	419 1668	3,97
8	168t/r1 <i>ade1</i>	— ADE	Кр Бел	364 1804	4,96
9	YTK/r1 <i>ade1</i>	— ADE	Кр Бел	181 435	2,40

Примечание. Двусторонний критерий знаков для 9 пар на 1 %-ном уровне: границы 1 и 8. Различия между красными (Кр) и белыми (Бел) клетками статистически значимы ($p < 0,01$).

Важно подчеркнуть, что высокая концентрация аденина в среде приводит к значительному увеличению ИФ осадочных белков только в штаммах, в генотипе которых есть мутации, блокирующие биосинтез аденина. Если же штаммы прототрофны по аденину (т.е. не несут мутации в генах, контролирующих путь биосинтеза аденина), то показатели интенсивности флуоресценции не зависят от количества аденина в среде.

Таким образом, количество амилоидов в осадочной фракции зависит от присутствия красного пигмента в клетках. В каждой изогенной паре белый штамм содержит амилоидную фракцию белков, которая у красного штамма значительно редуцирована. Мы задались вопросом, будет ли эта амилоидная фракция цитоплазматически наследуемой, т.е., передастся ли повышенный уровень интенсивности флуоресценции белых штаммов при цитодукции.

В таблицах 4 и 5 представлены данные по ИФ тиофлавина Т, связанного с осадочными белками цитодуктантов, получивших цитоплазму от красного (кр) или белого штамма-донора.

Таблица 4

Сравнение ИФ цитодуктантов, полученных в различных скрещиваниях штаммов-доноров [PSI^+]

А:(1) GT26/r1 [PSI^+] кр x АН/В [psi^-] кр		А: (2) GT26 [PSI^+] белый x АН/В [psi^-] кр	
	ИФ		ИФ
[PSI^+] розовые цитодуктанты	100 %	[PSI^+] розовые цитодуктанты	158 %
Штамм-донор GT26/r1 кр	100 %	Штамм -донор GT26 белый	617 %
Б:(1) К-13/r3 [PSI^+] кр x АН/В [psi^-] кр		Б:(2) К-13 [PSI^+] белый x АН/В [psi^-] кр	
	ИФ		ИФ
[PSI^+] розовые цитодуктанты	100 %	[PSI^+] розовые цитодуктанты	132 %
Штамм-донор К-13/r3 кр	100 %	Штамм-донор К-13 белый	749 %

А: Различия между ИФ цитодуктантов, полученных в скрещиваниях двух типов, статистически значимы, $p < 0,01$.

Б: Различия между ИФ цитодуктантов, полученных в скрещиваниях двух типов, статистически значимы, $p < 0,05$.

Сравнение ИФ цитодуктантов, полученных в различных скрещиваниях штаммов-доноров [$psi^- rho^+$]

А: (1) К-5[psi^-][rho^+] кр х 74-D[psi^-][rho^0] белый		А: (2) К-5/w1[psi^-][rho^+] кр х 74-D[psi^-][rho^0] белый	
	ИФ		ИФ
[psi^-][rho^+] белые цитодуктаны	100 %	[psi^-][rho^+] белые цитодуктаны	156 %
Штамм-донор К-5 кр.	100 %	Штамм донор К-5/w1 белый	187 %
Б:(1) 168t/r1 [psi^-][rho^+] кр х К-5/w1 [psi^-][rho^0] белый		Б:(2) 168t [psi^-][rho^+] белый х К-5/w1 [psi^-][rho^0] белый	
	ИФ		ИФ
[psi^-][rho^+] белые цитодуктаны	100 %	[psi^-][rho^+] белые цитодуктанты	137 %
Штамм-донор 168t/r1 кр	100 %	Штамм-донор 168t белый	449 %

А: Различия между ИФ цитодуктантов, полученных в скрещиваниях двух типов, статистически значимы, $p < 0,01$.

Б: Различия между ИФ цитодуктантов, полученных в скрещиваниях двух типов, статистически значимы, $p < 0,05$.

В таблице 4 представлены данные, полученные на цитодуктантах, в которые перешел прион [PSI^+]. В двух независимых скрещиваниях (А и Б) роль штамма-реципиента выполнял красный [psi^-] штамм АН/В, несущий супрессируемую нонсенс-мутацию в гене *ADE1*. В качестве штаммов-доноров, содержащих [PSI^+]-фактор, были выбраны штаммы красного цвета, несущие несупрессируемые нонсенс-мутации в генах *ADE1* (GT26 кр) и *ADE2* (К5-13 кр), которые приводили к накоплению красного пигмента. Среди потомков скрещивания отбирали по ядерным маркерам штамма-реципиента и по супрессии нонсенс-мутации в гене *ADE1* [PSI^+] гаплоидные гетерокариотические клоны. Средние значения ИФ для 6 цитодуктантов, получивших цитоплазму от белых штаммов-доноров, превышают ИФ для цитодуктантов, получивших цитоплазму от красных штаммов-доноров.

Чтобы оценить количество передаваемого цитодукцией амилоидного материала у белых [psi^-] штаммов, мы провели скрещивания, в которых

донорный и реципиентный штаммы отличались по наличию $[rho]$ фактора. Штаммы-реципиенты не содержали митохондриальной ДНК и не накапливали красный пигмент. В этих экспериментах отбирали $[rho^+]$ цитодуктанты. Данные, полученные в результате двух независимых скрещиваний (А и Б), представлены в табл. 5.

Можно видеть, что средние значения ИФ цитодуктантов, получивших $[rho^+]$ цитоплазму от штамма-донора красного цвета, значительно ниже средних значений ИФ цитодуктантов, получивших цитоплазму от изогенного штамма-донора белого цвета.

Таким образом, количество материала, окрашиваемого тиофлавином Т, является цитоплазматически наследуемым признаком и может передаваться белыми штаммами в отсутствие $[PSI^+]$ -фактора. Это является дополнительным доказательством того, что наличие красного пигмента влияет на уровень именно прионовых агрегатов, уменьшая их количество в клетках.

Одним из возможных объяснений подобного эффекта является связывание красного пигмента с амилоидными фибриллами, препятствующее либо их росту, либо образованию агрегатов с другими белками, что приводит к снижению количества амилоидных агрегатов в клетке. Для того, чтобы определить механизм действия пигмента, мы провели опыты в системе *in vitro*.

На рис. 4 представлены флуоресцентные спектры тиофлавина Т, связанного с амилоидами инсулина, сформировавшимися без красного пигмента (рис. 4, кривая 1) и в его присутствии (рис. 4, кривая 2). Видно, что добавление красного пигмента в раствор при образовании амилоидов приводит к значительному понижению интенсивности флуоресценции тиофлавина Т.

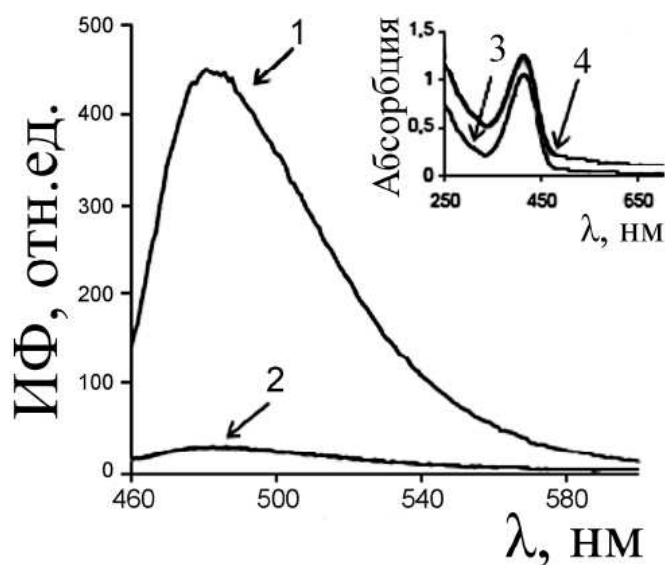


Рис. 4. Спектры флуоресценции тиофлавина Т, связанного с амилоидами инсулина, полученными в обычных условиях (1), а также с фибриллами инсулина, полученными в присутствии красного пигмента (2).

Вставка: абсорбционный спектр тиофлавина Т, связанного с амилоидами инсулина (3), а также с амилоидами инсулина, полученными в присутствии красного пигмента (4). ИФ – интенсивность флуоресценции.

Для амилоидов лизоцима наблюдались аналогичные закономерности.

Столь значительное снижение ИФ тиофлавина Т при связывании с амилоидными фибриллами, сформированными в присутствии красного пигмента, может объясняться как минимум двумя причинами. С одной стороны, красный пигмент может препятствовать связыванию тиофлавина Т с амилоидной фибриллой. С другой стороны, красный пигмент может непосредственно снижать количество или физический размер амилоидов в растворе.

Для прояснения этого вопроса был проведен следующий эксперимент. Измеряли интенсивность флуоресценции тиофлавина Т, связанного с амилоидами, (а) сформированными в обычных условиях; (б) сформированными в обычных условиях, после чего к ним добавили красный пигмент; (в) сформированными в растворе с добавлением красного пигмента.

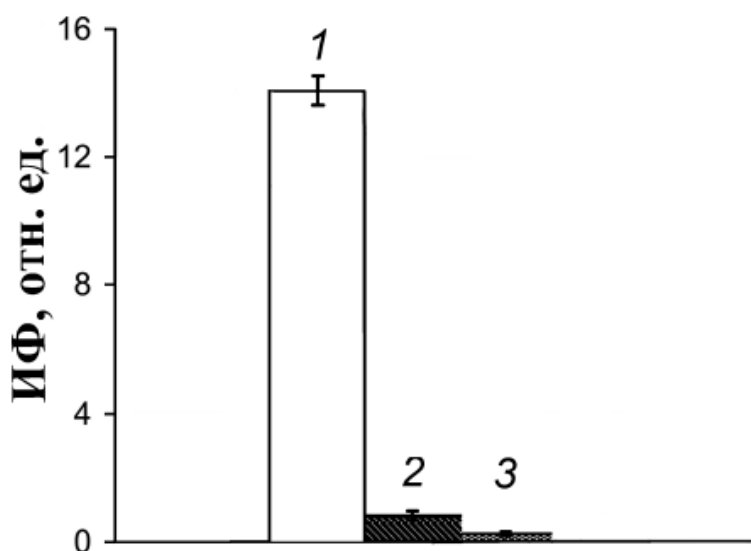


Рис. 5. Нормализованные значения ИФ тиофлавина Т, связанного с амилоидами инсулина, сформированными в обычных условиях (1), сформированными в обычных условиях, после чего к ним добавили красный пигмент (2), сформированными в присутствии красного пигмента (3). Вертикальными полосами представлены 95% доверительные интервалы.

Можно видеть, что образование амилоидных фибрилл в присутствии красного пигмента и добавление пигмента к уже сформированным амилоидам, приводят к примерно одному результату – значительному падению интенсивности флуоресценции тиофлавина Т. Необходимо подчеркнуть, что падение интенсивности флуоресценции до минимального уровня происходило очень быстро (в течение трех-пяти минут), а затем уже не менялось. Это означает, что, по крайней мере, в случае амилоидных

фибрилл инсулина и лизоцима, красный пигмент не способен вызвать их деструкцию.

Гипотеза о том, что красный пигмент не блокирует образование фибрилл, подтверждается и данными трансмиссионной электронной микроскопии. При формировании амилоидов в присутствии красного пигмента в препаратах инсулина и лизоцима наблюдали фибриллярные структуры, характерные для амилоидов. Однако для инсулина отмечали различия в средней длине фибрилл (рис. 6) – 700 ± 100 нм для фибрилл, сформированных в обычных условиях и 300 ± 50 нм для фибрилл, сформированных в присутствии красного пигмента.

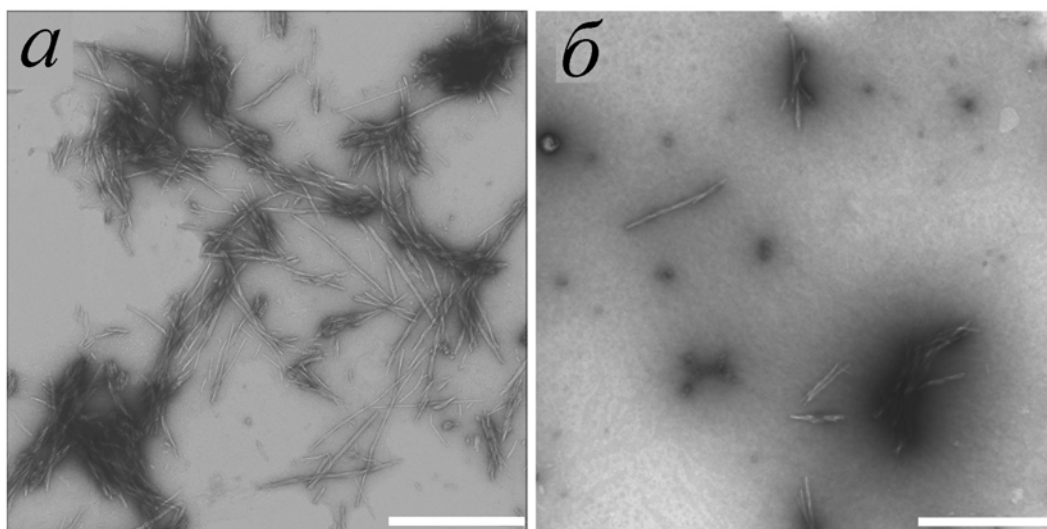


Рис. 6. Электронные микрофотографии амилоидов инсулина, полученных в обычных условиях (а), а также в присутствии красного пигмента (б). Увел.: 16000 \times . Масштаб: 500 нм.

В случае лизоцима наблюдалась только разница в плотности расположения фибрилл на подложке (рис. 7)

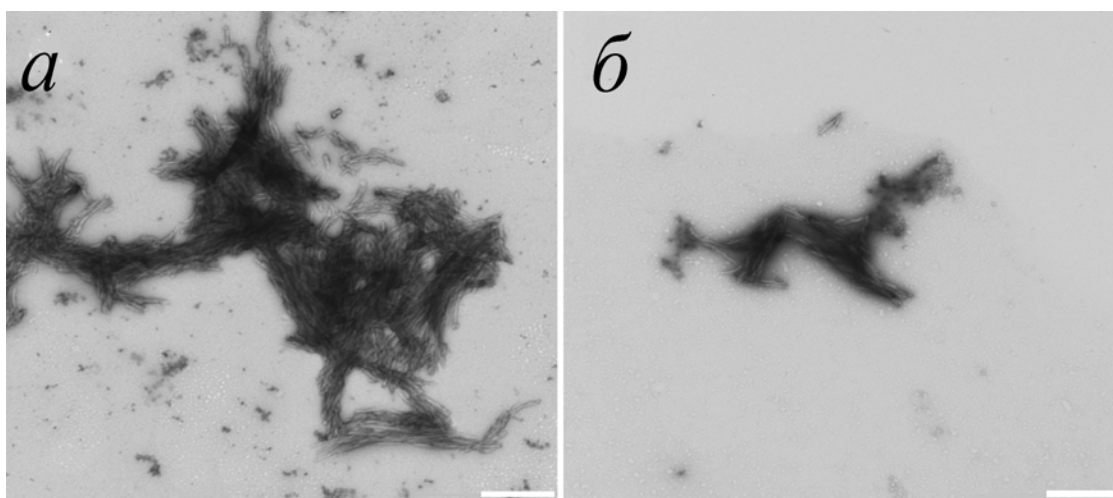


Рис. 7. Электронные микрофотографии амилоидов лизоцима, полученных в обычных условиях (а), а также в присутствии красного пигмента (б). Увел.: 8000 \times . Масштаб: 500 нм.

Таким образом, для объяснения столь значимых различий между флуоресценцией тиофлавина Т, связанного с амилоидами, сформированными без красного пигмента и в его присутствии мы предполагаем, что красный пигмент взаимодействует с фибриллами, конкурируя с тиофлавином Т за сайты связывания. Возможно, что аналогичным образом красный пигмент может действовать и в клетках дрожжей, препятствуя образованию комплекса амилоидов с другими белками клетки и тем самым опосредованно снижая количество амилоидов. Для подтверждения нашей гипотезы необходимо было определить, какие белки оказываются в составе агрегатов и попадают в осадочную фракцию, если в клетках не происходит накопления красного пигмента.

Раздел.2 Анализ пигмент-зависимых белков *S. cerevisiae*.

Для решения этой задачи мы использовали подход, в основе которого – сравнение белкового состава осадочных фракций, выделенных из клеток изогенных штаммов, отличающихся по цвету колоний (красных и белых). Двумерный электрофорез с последующей масс-спектроскопией позволили идентифицировать белки, нахождение которых в осадочной фракции зависело от присутствия в клетке красного пигмента.

При сравнении трех пар изогенных штаммов, отличающихся накоплением красного пигмента, было идентифицировано 48 белков, которые мы относим к категории пигмент-зависимых осадочных белков. Один из идентифицированных нами белков — Sod1 — способен амилоидизироваться в клетках млекопитающих (Munch et al., 2011). Возможно, что и в дрожжах этот белок может вести себя аналогичным образом.

Остальные пигмент-зависимые белки относятся к 4 основным функциональным классам. Более половины идентифицированных белков — шапероны и ферменты метаболизма глюкозы. Стоит также отметить белки, участвующие в клеточном ответе на окислительный стресс, и белки, участвующие в процессах трансляции и протеолиза. Это совпадает с данными о функциональных группах прион-зависимых белков, полученными в ряде лабораторий (Nevzglyadova et al., 2009). Представляет интерес и группа белков, участвующих в трансляции – их роль не кажется тривиальной и требует уточнения.

Мы составили таблицу взаимодействий между идентифицированными белками. Группы белков, способные взаимодействовать с тем или иным прионом, соотнесены с классификацией, основанной на функции идентифицированных белков в клетке (табл. 6). Для краткости выделенные нами группы обозначены по имени приона, или другого, характерного для группы, белка. Из 48 идентифицированных белков 9 способны непосредственно взаимодействовать с прионами.

Взаимодействия между группами белков

Группа взаимодействия: Функциональная группа:	SUP35:	RNQ1:	NEW1:	ADH1:	Нет взаимодействия с остальными группами
Шапероны и кошапероны	<u>Hsc82</u> (132000) <u>Ssa1</u> (269000) <u>Ssa2</u> (364000)		<u>Hsp26</u> (19300)	<u>Eno2</u> (2610)	<u>Cdc48</u> (78400) <u>Cpr3</u> (1960) <u>Hsp78</u> (2990)
Белки метаболизма глюкозы и цикла Кребса			<u>Aco1</u> (96700)	<u>Adh1</u> (?) <u>Eno2</u> (2610) <u>Pgk1</u> (314000) <u>Tpi1</u> (207000) <u>Fba1</u> (1020000)	<u>Ald4</u> (22200) <u>Eno1</u> (76700) <u>Gpm1</u> (172000) <u>Hxk2</u> (114 000) <u>Tdh1</u> (120000) <u>Tdh3</u> (169000)
Белки трансляции	<u>Efb1</u> (?) <u>Asc1</u> (333000)				<u>Tef2</u> (450) <u>Tuf1</u> (58 500)
Белки, связанные со стрессом					<u>Sod1</u> (519 000) <u>Mcr1</u> (1920) <u>Tma19</u> (27800) <u>Zeo1</u> (?) <u>Gvp36</u> (7720)
Другие белки			<u>Por1</u>		<u>Aco2</u>

			(?) Psa1 (97100)		(4670) <u>Shm1</u> (17700)
--	--	--	------------------------	--	----------------------------------

П р и м е ч а н и я. Таблица создана на основе базы данных: Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>), 20.02.2011. Группировка белков основана на способности идентифицированных в настоящей работе белков взаимодействовать с белками известных прионов. В скобках указано число молекул на клетку. Подчеркнуты белки, присутствующие в количестве меньшем, чем 50000 молекул на клетку. Вопросительный знак означает отсутствие данных по количеству белка в базе данных.

Состав пигмент-зависимых белков в целом близок к составу агрегатов, формируемых амилоидоподобным полиглутаминовым доменом, и к спектру белков, вовлекаемых в агресомы – белковые агрегаты, формируемые для очищения клеток от поврежденных белков (Wang et al., 2008). Эта близость явно не случайна, так как в нашем списке присутствует один из ключевых белков дрожжевых агресом – Cdc48 (окислительный стресс и протеолиз также связаны с функцией агресом). Дальнейший анализ этих белков может подтвердить возможность их прямого или опосредованного влияния на образование амилоидных агрегатов в дрожжевой клетке.

Принимая во внимание снижение количества амилоидов у красных штаммов по сравнению с белыми, мы предлагаем следующую гипотезу для объяснения перекрытия спектров пигмент-зависимых белков с белками агресом. Пигмент-зависимые белки входят в число амилоид-зависимых белков. Связь с амилоидами заставляет их переходить в агрегированное состояние и попадать в осадочную фракцию, в частности, в состав агресом. Накопление красного пигмента затрудняет связывание идентифицированных белков с амилоидами, так как он занимает необходимые для этого сайты. Поэтому уровень этих белков в осадочной фракции зависит от накопления красного пигмента и для красных клеток оказывается сниженным по сравнению с белыми.

Тот факт, что мы выявили среди пигмент-зависимых белков несколько шаперонов, позволяет выдвинуть гипотезу о механизме влияния красного пигмента на прионы дрожжевых клеток. Мы предполагаем, что в клетках дрожжей к снижению количества белков в амилоидной форме приводит способность красного пигмента связываться с амилоидами, в результате нарушая связи прионовых полимеров с шаперонами, ответственными за разделение фибрилл на небольшие части, что обеспечивает размножение прионов.

Таким образом, основной вывод, который можно сделать на основании нашей работы, состоит в том, что красный пигмент дрожжей снижает

количество амилоидных агрегатов в клетке, связываясь с фибриллами и не допуская их взаимодействия с другими белками клетки.

Дальнейшим развитием работы должно стать расширение круга патогенных белков, на которые способен влиять красный пигмент, определение структуры красного пигмента, а также проверка экзогенного противоамилоидного действия этого соединения на культурах животных клеток и организмах.

Выводы

1. Количество агрегатов, содержащих белки в амилоидной форме, значительно снижено в дрожжевых клетках, накапливающих красный пигмент – продукт полимеризации аминокислоты риботида.

2. Присутствие красного пигмента в клетках дрожжей приводит к снижению в них количества $[PSI^+]$ -фактора – прионной формы белка Sup35.

3. Разработан метод, позволяющий дать количественную сравнительную оценку количества амилоидов в штаммах *Saccharomyces cerevisiae*

4. В опытах *in vitro* показано, что красный пигмент не вызывает деструкцию амилоидов, а связывается с амилоидными фибриллами. При образовании амилоидов в присутствии красного пигмента наблюдается торможение роста амилоидных фибрилл инсулина.

5. Идентифицированы 48 белков, присутствие которых во фракции агрегированных белков зависит от наличия красного пигмента в клетке. К этим пигмент-зависимым белкам относятся, в первую очередь, шапероны, белки, вовлеченные в метаболизм глюкозы, белки, вовлеченные в стрессовый ответ, в процесс трансляции и протеолиз.

6. Предложен механизм действия красного пигмента *in vivo*, который состоит в связывании красного пигмента с амилоидными фибриллами, что приводит к снижению доступности этих участков для факторов, участвующих в амилоидогенезе. Эта гипотеза подтверждается тем, что пигмент-зависимые белки, идентифицированные нами, относятся к тем же функциональным классам, что и белки, входящие, по оценкам разных лабораторий, в прионовые агрегаты.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Невзглядова О.В., Кузнецова И.М., Артемов А.В., Михайлова Е.В., Туроверов К.К., Сойдла Т.Р. Сравнительная оценка содержания амилоида и прионов в клетках дрожжей // Цитология. 2008. 50(1): 40—48. English translation: Nevzglyadova O. V., Kuznetsova I. M., Artemov A. V., Mikhailova E. V., Turoverov K. K., Soidla T. R. Comparative assay of amyloid and prion contents in yeast cells // Cell and Tissue Biology. 2008. 2(1): 71–80.
2. Невзглядова О.В., Артемов А.В., Миттенберг А.Г., Михайлова Е.В., Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Сойдла Т.Р. Влияние красного

- пигмента на амилоидизацию белков у дрожжей // Цитология. 2010. 52(1): 80—93. English translation: Nevzglyadova O.V., Artemov A.V., Mittenberg A.G., Mikhailova E.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Soidla T.R. The effect of red pigment on amyloidization of yeast proteins. *Cell and Tissue Biology*. 2010. 4(2): 152—166.
3. Nevzglyadova O.V., Artemov A.V., Mittenberg A.G., **Mikhailova E.V.**, Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Soidla T.R. Yeast protein aggregates, containing chaperones and glucose metabolism enzymes. In: *Handbook of Molecular Chaperones: Roles, Structures and Mechanisms* (P. Durante and L. Colucci, Eds). Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA. 2010. P.241-270.
 4. **Mikhailova E.V.**, Nevzglyadova O.V., Artyomov A.V., Soidla T.R. Prion-associated proteins in yeast: comparative analysis of yeast strains, distinguished by their prion content // *Proceedings of the young scientists school "Bioinformatics and systems biology"*. Новосибирск. 2010.
 5. Nevzglyadova O.V., Kuznetsova I.M., **Mikhailova E.V.**, Artamonova T.O., Artemov A.V., Mittenberg, A.G., Kostyleva, E.I., Turoverov, K.K., Khodorkovskii, M.A., Soidla, T.R. The effect of red pigment on amyloidization of yeast proteins // *Yeast*. 2011. 28 (7): 505—526.
 6. **Михайлова Е.В.**, Артемов А. В., Снигиревская Е.С., Артамонова Т.О., Ходорковский М. А., Сойдла Т. Р., Невзглядова О.В. Влияние красного пигмента *Saccharomyces cerevisiae* на образование инсулиновых фибрилл in vitro // *Цитология*. 2011. 53(10): 808—814. English translation: Mikhailova, E.V., Artemov, A.V., Snigirevskaya, E.S., Artamonova, T.O., Khodorkovskii, M. A., Soidla, T.R., Nevzglyadova, O.V. The effect of red pigment on insulin fibril formation in vitro // *Cell and Tissue Biology*. 2011. 5(6): 580-585.
 7. **Михайлова Е.В.**, Артемов А.В., Сойдла Т.Р., Невзглядова О.В. Влияние красного пигмента на амилоидизацию дрожжевых белков // Тез. V российского симпозиума "Белки и пептиды". – Петрозаводск. 2011.
 8. Сойдла Т.Р., Невзглядова О.В., **Михайлова Е. В.**, Артемов А.В., Миттенберг А.Г., Костылева Е. И., Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Артамонова Т.О., Ходорковский М. А. Прион-зависимые белки и влияние красного пигмента дрожжей на амилоиды in vivo и in vitro. В сборнике: Санкт-Петербургский научный форум «Наука и общество: Физиология и медицина XXI века». VI Петербургская встреча лауреатов Нобелевской премии. 2011.

Список цитируемой литературы

- Bagriantsev S.N., Kushnirov V.V., Liebman S.W. Analysis of amyloid aggregates using agarose gel electrophoresis // *Methods Enzymol.* 2006. 412: 33—48.
- Charveriat M., Reboul M., Wang Q., le Picoli C., Lenuzza N., Montagnac A., Nhiri N., Jacquet E., Gueritte F., Lallemand J-Y., Deslys J-P., Mouthon F. New inhibitors of prion replication that target the amyloid precursor // *J. Gen. Virology*. 2009. 90: 1294—1301.

- Chernoff Y.O. Replication vehicles of protein-based inheritance // Trends Biotechnol.2004. 22(11): 549–552.
- Herczenik E., Gebbink M.F.B.G. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease // FASEB J. 2008. 22: 2115–2133.
- Kryndushkin D.S., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V. Yeast [PSI⁺] protein aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 // J. Biol. Chem. 2003. 278: 49636–49643.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. 227(5259): 680–685.
- Munch C., O'Brien J., Bertolotti A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. 108: 3548–3553.
- Nevzglyadova O.V., Artemov A.V., Mittenberg A.G., Solovyov K.V., Kostyleva E.I., Mikhailova E.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Soidla T.R. Prion-associated proteins in yeast: comparative analysis of isogenic [PSI⁺] and [psi⁻] strains // Yeast. 2009. 26(11): 611–631.
- Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C.F., Terry C.J., Feast T.G., Zalin T.G., Hsuan J.J. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis // Nature. 1993. 362: 553–556.
- Smirnov M.N., Smirnov V.N., Budowsky E.I, Inge-Vechtomov S.G., Serebrjakov N.G. Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem. Biophys. Res. Com. 1967. 27: 299–304.
- Summers D., Cyr D. Use of yeast as a system to study amyloid toxicity // Methods. 2011. 53: 226–231.
- Wang Y, Meriin A.B., Zaarur N., Romanova N.V., Chernoff Y.O., Costello C.E., Sherman M.Y. Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery // FASEB J. 2008. 23: 451–463.
- Wickner R., Shewmaker F., Kryndushkin D., Edskes H. Protein inheritance (prions) based on parallel in-register beta-sheet amyloid structures // Bioessays. 2008. 10: 955–964.
- Xue W., Hellewell A., Hewitt E, Radford S. Fibril fragmentation in amyloid assembly and cytotoxicity. When size matters // Prion. 2010. 4(1): 20–25.
- Zakharov I.A., Yarovoy B. Cytoinduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast // Mol. Cell Biochem.1977.14: 15–18.